پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۹ شمارهٔ۱، نیمهٔ اول ۱۳۹۷، صفحهٔ ۱۵۱-۱۴۲

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 9, No. 1, 2018, p. 142-151
DOI: 10.22067/ijpr.v9i1.56724

بررسی تاکسونومی و بیماریزایی جدایه‌های قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری شانکر ساقه و ریشه لوبیا در استان خراسان شمالی

پریسا طاهری[1*] و ضحا درودی[2]

۱- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۰

چکیده

به‌منظور شناسایی گروه‌های مختلف تاکسونومیکی رایزوکتونیا بیماریزا در لوبیاقرمز، از گیاهان آلوده به این بیماری با علایم شانکر ریشه و ساقه در استان خراسان شمالی طی سال ۱۳۹۳ نمونه‌برداری صورت گرفت. پس از کشت بافت‌های آلوده،۳۲جدایه رایزوکتونیا به‌دست آمد. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی و همچنین به روش مولکولی انجام شد که ۲۹جدایه متعلق به گونهٔ *Rhizoctonia solani* چندهسته‌ای و سه جدایه رایزوکتونیاهای دوهسته‌ای بودند. برای شناسایی دقیق گروه‌های تاکسونومیکی *R. solani* از آنالیز PCR-RFLP استفاده شد. ناحیه ITS از rDNA توسط دو آغازگر اختصاصی گونه *R. solani* به نام‌هایRS1 و RS4 تکثیر و محصول آن توسط آنزیم‌های *Ava*II و *Hinc*II مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و گروه و زیرگروه‌های آناستوموزی تعیین شدند. از ۲۹جدایه فوق ۱۷جدایه متعلق به AG4 HG-I و ۱۲ جدایه AG4 HG-II شناسایی شدند. آزمایشات بیماریزایی بر روی لوبیاقرمز رقم ناز نشان داد که جدایه‌های رایزوکتونیای دوهسته‌ای از توان بیماریزایی کمتری بر روی ریشه و ساقه گیاه میزبان برخوردارند. شدت بیماریزایی زیرگروه‌های آناستوموزی AG4 HG-I و AG HG-II تقریباً در یک سطح بود. این اولین گزارش از تعیین وضعیت دقیق تاکسونومیکی و بیماریزایی جدایه‌های قارچ رایزوکتونیای به‌دست‌آمده از مزارع لوبیا در ایران می باشد.

واژه‌های کلیدی: شناسایی، گروه تاکسونومیکی، PCR-RFLP، *Phaseolus vulgaris*، *Thanatephorus cucumeris*

مقدمه

بیماری‌های رایزوکتونیایی لوبیا انتشار جهانی داشته و شامل مرگ گیاهچه قبل و بعد از سبزشدن، شانکر ریشه و ساقه و سوختگی اندام هوایی گیاه می باشند (Keshavarz-Tohid & Taheri, 2015; Nerey *et al*., 2010). هنگامی که گیاهان لوبیا دچار تنش هستند، یا به‌ویژه بر اثر حملهٔ نماتدهای گال ریشه آسیب دیده باشند، شانکر رایزوکتونیایی ریشه و ساقه بسیار شدید می شود. عامل این بیماری قارچ خاکزاد چندهسته‌ای *R. solani* Kuhn می‌باشد که فرم جنسی آن *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk است (Carling, 1996; Gonzalez Garcia *et al*., 2006).

R. solani به‌عنوان یک بازیدیومیست خاکزاد که دامنهٔ میزبانی وسیعی دارد و گیاهان زراعی و غیرزراعی متعددی را مورد حمله قرار می‌دهد، تاکنون بسیار مورد بررسی قرار گرفته است. با وجود مطالعات زیاد هنوز زوایای مختلف بیولوژی و تاکسونومی‌قارچ *R. solani* ناشناخته است و به‌عنوان یک گونه پیچیده شناخته شده است (Cubeta & Vilgalys, 1997). در قارچ نکروتروف *R. solani* مجموعه ای از گروه‌های درون گونه ای همگن وجود دارند که به وسیلهٔ واکنش آناستوموز هیفی بین ایزوله‌ها از یکدیگر متمایز می‌شوند و گروه‌های آناستوموزی (Anastomosis Groups; AGs) نام دارند. جدایه‌های هر گروه آناستوموزی فقط قابلیت آناستوموز با ایزوله‌های دیگر از همان گروه آناستوموزی را دارا می‌باشند. تاکنون ۱۴گروه آناستوموزی شامل AG1-AG13 و AGBI برای *R. solani* توصیف شده است (Carling, 1996; Gonzalez Garcia *et al*., 2006). برخی از گروه‌های آناستوموزی دامنه میزبانی وسیعی دارند، درحالی‌که برخی دیگر بسیار اختصاصی عمل می‌کنند. همچنین یک گونهٔ گیاهی می‌تواند میزبان چندین گروه آناستوموزی باشد (Herr, 1996; Gonzalez Garcia *et al*., 2006). بعضی از گروه‌های آناستوموزی شامل چند زیرگروه موسوم به گروه‌های ویژه داخلی (Intraspecific Groups; ISGs) می‌باشند که این

*نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، کدپستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۸، p-taheri@um.ac.ir

زیرگروه‌ها از نظر دامنۀ میزبانی، نیازهای غذایی، خصوصیات مورفولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی با یکدیگر متفاوت هستند. زیرگروه‌های هر گروه آناستوموزی از نظر ژنتیکی توسط روش‌های مولکولی از یکدیگر متمایز می‌شوند، ولی از طریق آناستوموز هیفی تفکیک آن‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد (Cubeta *et al*., 2002; Pourmahdi & Taheri, 2015; Sneh *et al*., 1991). به‌وجودآمدن روش‌های مولکولی سبب شده که این روش‌های جدید جایگزین روش‌های قدیمی‌تر مطالعۀ جمعیت های رایزوکتونیا شوند (Ogoshi, 1996).

در لوبیا، گروه‌های آناستوموزی AG2-2 (IIIB, IV) وAG4 (HG-I, HGII, HG-III) به‌عنوان عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در نواحی مختلف کشت لوبیا در دنیا گزارش شده اند (Gonzalez Garcia *et al*., 2006; Guillemaut *et al*., 2003 Nerey *et al*., 2010). درحالی که بیماری سوختگی اندام هوایی لوبیا عمدتاً در اثر جدایه‌های AG1-1A و AG1-1B (Godoy-Lutz *et al*., 2008) و AG4 HG-I (Yang 2007) ایجاد می‌شود. در ایران جدایه‌های این قارچ متعلق به گروه آناستوموزی AG4 در مزارع لوبیای استان اصفهان شناسایی شده‌اند (Balali & Kowsari, 2004). تاکنون مطالعات دقیقی درمورد شناسایی گروه‌های مختلف تاکسونومیکی *R. solani* عامل بیماری پوسیدگی و شانکر ساقه، طوقه و ریشه لوبیا در ایران انجام نشده است. با توجه به دامنه میزبانی متفاوت گروه‌های مختلف تاکسونومیکی *R. Solani*، شناسایی دقیق گروه‌ها و زیرگروه‌های آناستوموزی این قارچ مخرب در مدیریت مؤثر این بیماری بسیار حائز اهمیت است.

شناسایی سطوح مختلف تاکسونومیکی جنس رایزوکتونیا به‌کمک روش‌های مولکولی انجام شده است. نتایج بررسی‌های مولکولی محدودۀ گروه‌های آناستوموزی را تأیید و مشخص کرده است و پیشرفت قابل‌ملاحظه ای در تشخیص ISGs به‌عنوان واحدهای اساسی طبقه‌بندی درون گروه‌های مختلف آناستوموزی رایزوکتونیا صورت گرفته است. معتبرترین دیدگاه ها پیرامون AG و ISG از مطالعات مربوط به طبقه‌بندی مولکولی حاصل شده است. روش‌های مولکولی که تا به حال جهت بررسی تاکسونومیکی رایزوکتونیا به کار رفته‌اند شامل آیزوزایم‌ها، هیبریداسیون DNA/DNA، آنالیزRFLP، نشانگرهای مولکولی بر پایۀ PCR و توالی یابی DNA می‌باشد (Vilgalys & Cubeta, 1994). توالی‌هایی از DNA که RNA ریبوزومی را کد می‌کنند، نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی و تاکسونومیکی بین قارچ‌ها به‌حساب می آیند. در قارچ‌ها ژن‌های مسئول تولید RNA ریبوزومی عمدتاً در داخل هسته قرار گرفته‌اند. ژن‌های RNA ریبوزومی هسته ای در دو گروه 18S ویژه زیر واحد ریبوزومی‌کوچک و 5.8S و 28S ویژه زیر واحد بزرگ ریبوزوم قرار می‌گیرند. فاصلۀ بین قطعات 18S و 28S توسط دو ناحیۀ فاصله‌ساز داخلی ITS1 و ITS2 و یک قطعه 5.8S پُر شده است. روش‌های مولکولی بر اساس آنالیز توالی ژن‌های مسئول تولید RNA ریبوزومی روشی سریع و قابل‌اعتماد برای شناسایی جمعیت‌های *R. solani* در سطح AG و همچنین شناسایی زیرگروه‌های آناستوموزی می‌باشد (Guillemaut *et al*., 2003). به‌منظور داشتن اطلاعات کامل و دقیق در مورد گروه‌های تاکسونومیکی و تنوع جمعیت‌های *R. solani*، تشخیص گونه‌های مختلف این قارچ تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، به‌دلیل عدم ثبات این خصوصیات در محیط کشت کافی و دقیق نمی‌باشد (Taheri *et al*., 2007). همچنین تشخیص گروه‌های آناستوموزی از طریق پیوند ریسه احتیاج به صرف زمان و تجربۀ زیادی دارد (Guillemaut *et al*., 2003). هدف اصلی در این بررسی، تفکیک سطوح مختلف تاکسونومیکی شامل گونه، گروه آناستوموزی و زیرگروه آناستوموزی قارچ *R. solani* بیماریزا در لوبیا بر اساس روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و همچنین کاربرد روش PCR-RFLP برای ناحیۀ ژنومیrDNA-ITS می‌باشد. در این تحقیق بیماریزایی جدایه‌ها نیز بر روی لوبیاقرمز رقم ناز در گیاهان چهار هفته‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ عامل بیماری

بافت‌های گیاهی آلوده به بیماری رایزوکتونیایی از مزارع لوبیای مناطق عمده کشت این گیاه در استان خراسان شمالی شامل بجنورد، شیروان و فاروج در طی فصل زراعی سال۱۳۹۳ جمع‌آوری گردیدند. بعد از شستشوی سطحی نمونه‌ها با آب فراوان، قطعات کوچک به اندازۀ ۴-۳ میلی‌متر از مرز بین بافت سالم و آلودۀ ساقه، ریشه‌های اصلی و فرعی که علایم شانکر را داشتند، تهیه گردید و توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵درصد به مدت ۱ تا ۲ دقیقه ضدعفونی‌شدند. سپس سه مرحله شستشو در آب‌مقطر سترون انجام شد. هر قطعه پس از خشک‌شدن بر روی کاغذ صافی سترون، بر روی محیط کشت سیب زمینی- دکستروز-آگار (Potato-Dextrose-Agar؛ PDA) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل قرار داده شد و در انکوباتور تاریک با دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سه روز محیط کشت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و مشخصات میسلیوم مربوط به گونه‌های رایزوکتونیا ارزیابی گردید. جهت خالص‌سازی قارچ

رایزوکتونیا از روش نوک ریسه در محیط کشت آب-آگار یک درصد استفاده شد و سپس با انتقال آن به PDA کشت خالص آن تهیه گردید. برای نگهداری کوتاه‌مدت، هر جدایه به محیط کشت PDA انتقال یافت و در دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از رشد کامل و تولید اسکلروت‌ها محیط کشت‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی

در ابتدا تمام جدایه‌ها از نظر تعداد هسته در سلول‌های جوان هیف از طریق رنگ‌آمیزی هسته بررسی شدند. برای رنگ‌آمیزی هسته از سافرانین (Bandoni, 1979) استفاده شد. در این روش در وسط هر لام یک دیسک از پرگنه درحال‌رشد قارچ قرار داده شد این لام‌ها در انکوباتور در دمای ۲۶درجهٔ سانتی‌گراد برای ۳-۲ روز نگهداری شدند، سپس در طرفین پرگنهٔ قارچ دو قطره معرف رنگی سافرانین ریخته و کمی حرارت داده شد. لامل به آرامی بر روی تودهٔ هیف قرار داده شد و در بزرگنمایی ۴۰۰ شمارش هسته‌ها صورت گرفت. همچنین به کمک این رنگ‌آمیزی وجود دیوارهٔ عرضی بشکه‌ای ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری قطر ریسه، ابعاد سلول‌های مونیلیوئید و اسکلروت و همچنین بررسی مورفولوژی پرگنه، هر جدایه بر روی سه عدد پتری حاوی محیط PDA کشت شد و در انکوباتور با دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از سه هفته صفات ذکرشده مورد بررسی قرار گرفتند (Falahati-Rasregar *et al.*, 2010). برای تعیین گروه‌های آناستوموزی جدایه‌های *R. solani* به روش Carling *et al*, (2002) آناستوموز بین ریسه‌های جدایه‌های به‌دست‌آمده از لوبیا و جدایه‌های استاندارد هر گروه آناستوموزی مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA

برای این منظور از محیط کشت‌های ۵ تا ۶ روزهٔ قارچ قطعهٔ کوچکی به شعاع پنج میلی‌متر برداشته شد و تحت شرایط سترون به ویال‌های ۵۰میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز منتقل گردید. سپس ویال‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۷ روز لایه میسلیومی روی سطح محیط کشت به کمک کاغذ صافی جدا گردید و سپس پودر شد. برای استخراجDNA از کیت استخراج DNA شرکت Bioneer کشور کره جنوبی استفاده شد. رسوب DNA استخراج‌شده بسته به حجم رسوب در ۲۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. جهت تعیین کیفیت DNA استخراجی از الکتروفورز در ژل آگارز ۲درصد، با استفاده از بافر (1X) TAEبا ولتاژ ۹۰ولت استفاده شد(Taheri *et al.*, 2007) . همچنین جهت تعیین کمیت DNA از اسپکتروفتومتر استفاده گردید. DNA نهایتاً در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای تشخیص گونه *R. solani* در این تحقیق از آغازگرهای اختصاصی این گونه شامل RS1 با توالیCCTGTGCACCTGTGAGACAG و RS4 (TGTCCAAGTCAATGGACTAT) در واکنش PCR استفاده گردید (Guillemaut *et al.*, 2003). ارزیابی محصول PCR در الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱درصد و با استفاده از بافر (1X) TBE، در ولتاژ ۱۲۰ولت برای مدت زمان ۳۰دقیقه صورت گرفت.

تعیین گروه‌های آناستوموزی و آنالیز PCR-RFLP برای ناحیهٔ rDNA-ITS

برای اطمینان از تشخیص گروه‌های آناستوموزی مشخص شده به روش آناستوموز بین ریسه‌ها و همچنین تشخیص زیرگروه‌های آناستوموزی از آنالیز چندشکلی ایجادشده در ناحیهٔ ITS از DNA ریبوزومی (rDNA-ITS) جدایه‌های مختلف *R. solani* استفاده شد (Guillemaut *et al.*, 2003). در این فرایند ابتدا ناحیهٔ rDNA-ITS در واکنش PCR تکثیر شد. سپس محصول PCR توسط آنزیم‌های برشی *Ava*II و *Hinc*II مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. هر یک از واکنش‌های PCR-RFLP در حجم ۲۵میکرولیتر شامل ۱۰میکرولیتر محصول PCR،۲-۱واحد آنزیم برشی،۱۰میکرولیتر بافر واکنش و ۱۸میکرولیتر آب دوبارتقطیر سترون انجام شد. از دو آنزیم برشی *Ava*II و *Hinc*II به‌صورت همزمان در یک واکنش استفاده گردید. در استفاده از آنزیم‌های برشی*Ava*II و *Hinc*II میکروتیوب‌ها در حمام آب گرم به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. لازم به ذکر است که آنزیم‌های برشی مورد استفاده ساخت شرکت Fermentase بودند. پس از آن میکروتیوب‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی بیماریزایی

بیماریزایی جدایه‌های *R. solani* بر روی رقم لوبیا موبیل که حساس به بیماری و غالب در منطقه می‌باشد، صورت گرفت. ابتدا بذور لوبیا به‌طور مسقیم در گلدان‌های پلاستیکی کشت شدند. خاک گلدان‌ها مخلوطی از خاک زراعی، خاک برگ، ماسه، پرلیت و ورمی‌کمپوست بود که در اتوکلاو در دمای

۱۲۱درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت یک ساعت سترون شده بود. در هر گلدان یک بذر لوبیا کشت شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. در هر تکرار، سه گیاه برای مایه‌زنی هر جدایه درنظر گرفته شد. گلدان ها در شرایط گلخانه با دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ساعت روشنایی و ۸ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهان لوبیا چهار هفته پس از سبزشدن برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه مایه تلقیح از بذور گندم کلونیزه‌شده با ریسه‌های قارچ رایزوکتونیا استفاده شد (Nikraftar *et al.*, 2013). ابتدا ۳۰۰ گرم بذر گندم درون هر ظرف شیشه‌ای ریخته شد. ۳۰۰میلی‌لیتر آب به آن اضافه گردید و برای سه روز متوالی در اتوکلاو سترون شد. سپس در شرایط کاملاً سترون بذور گندم به پتری‌های شیشه‌ای منتقل‌شدند و در داخل هر پتری یک دیسک میسلیومی به قطر ۵میلی‌متر از حاشیۀ پرگنه ۷روزه قارچ رایزوکتونیا اضافه گردید. پتری‌ها به مدت ۵روز در انکوباتور دمای ۲۸درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از پوشش کامل بذرهای گندم با قارچ، از آن‌ها جهت تلقیح گیاهچه‌های سالم لوبیا در زمان چهار هفته پس از سبزشدن گیاه استفاده شد. برای تلقیح به مقدار ۳۰گرم از بذرهای گندم کلونیزه شده با قارچ در اطراف ساقه هر گیاه ریخته شد. گلدان‌ها در گلخانه دردمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰درصد نگهداری‌شدند. پس از گذشت ۷روز از زمان مایه‌زنی، ثبت علایم با اندازه‌گیری طول زخم ناشی از هر ایزوله بر روی گیاه صورت گرفت. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS.12 استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از آزمون‌های مقایسه‌ای Kruskall-Wallis تکمیل‌شده با آزمون Mann-Whitney در سطح P=0.05 انجام شد.

نتایج و بحث

مشخصات مورفولوژیکی

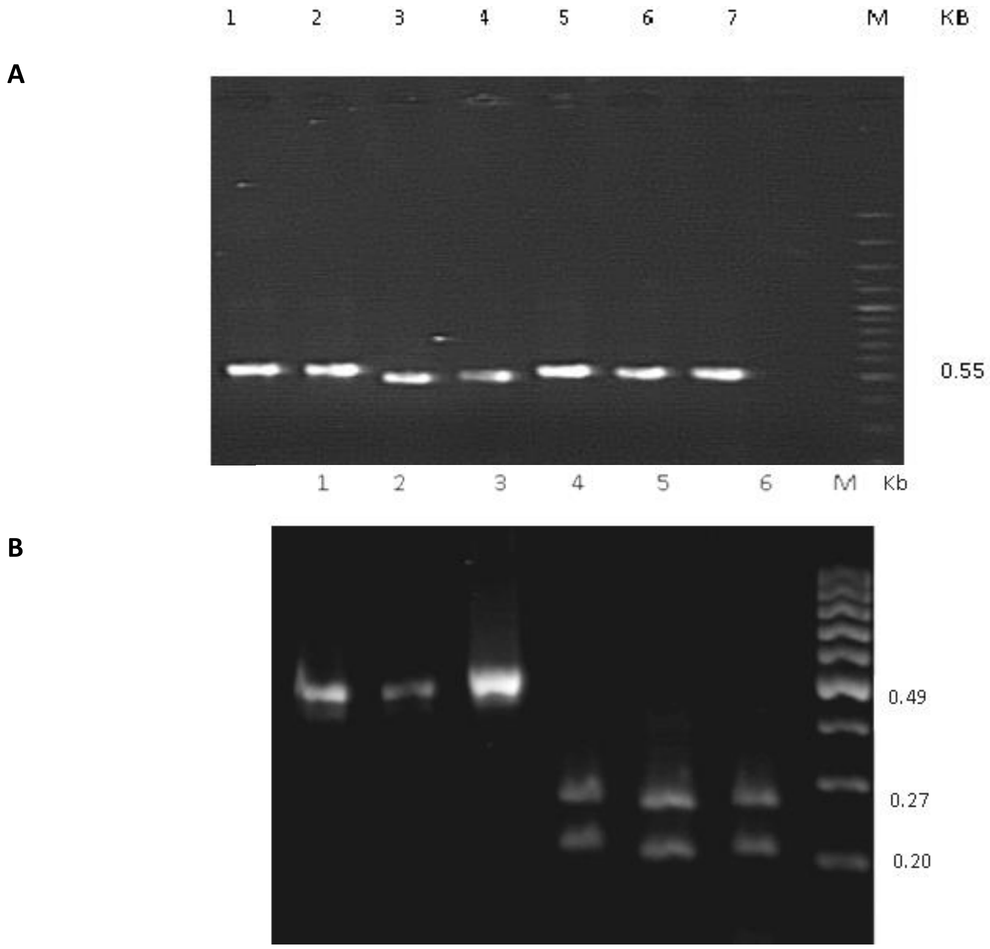
در این پژوهش شناسایی مورفولوژیکی ۳۲جدایه قارچ رایزوکتونیای جداسازی‌شده از مناطق عمده کشت لوبیا در استان خراسان شمالی بر اساس کلید شناسایی این قارچ (Sneh *et al.*, 1991) صورت گرفت. بر این اساس ریسه‌های قارچ دارای قطرهای متفاوت با انشعابات قائمه بودند. در قاعدۀ انشعابات فرورفتگی مشخص دیده شد که یک دیوارۀ عرضی کمی بالاتر از محل فرورفتگی وجود داشت. سلول‌های مونیلیوئید نیز به‌صورت زنجیره‌هایی ساده یا منشعب وجود داشتند. نتایج آزمون رنگ‌آمیزی هسته نشان داد که ۲۹جدایه چندهسته‌ای و سه جدایه دوهسته‌ای می‌باشند. تعداد هسته در سلول‌های ریسه در جدایه‌های چندهسته‌ای بین ۴ تا ۱۲عدد متغیر بود. در جدایه‌های چندهسته‌ای اندازۀ ابعاد سلول‌های مونیلیوئید ۳۷-۲۰×۱۸-۹ میکرومتر، ابعاد اسکلروت ۲.۵-۰.۳ میلی‌متر و قطر هیف اصلی ۱۱- ۸میکرومتر بود. در حالی‌که در جدایه‌های دوهسته‌ای به‌ترتیب اندازۀ ابعاد سلول‌های مونیلیوئید ۲۷-۱۹×۱۴-۱۰ میکرومتر، ابعاد اسکلروت ۰/۵-۰/۲ میلی‌متر و قطر هیف اصلی ۸-۵ میکرومتر بود. در رایزوکتونیاهای چندهسته‌ای رنگ پرگنۀ قارچ در محیط کشت PDA در ابتدا سفید بود که به مرور زمان به قهوه‌ای تغییر رنگ می‌داد. در مورد رایزوکتونیاهای دوهسته‌ای نیز رنگ پرگنه در محیط کشت PDA در ابتدا سفید رنگ بود که به تدریج کرم رنگ می‌شد. به‌طورکلی رنگ و شکل پرگنه جدایه‌ها در محیط کشت PDA در مقایسه با محیط کشت WA متنوع‌تر بود. جدایه‌های دوهسته‌ای نیز به‌طور متعددی تولید اسکلروت‌های ریز کروی‌شکل می‌کردند. به‌طورکلی قارچ *R. solani* جداشده از این گیاه زراعی از نظر رنگ پرگنه، قطر ریسه، فرورفتگی در محل انشعابات ریسه، محل تشکیل دیواره عرضی، شکل سلول‌های مونیلیوئید، تعداد هسته در هر سلول ریسه و تشکیل اسکلروت با سایر گزارش‌ها (Ogoshi, 1987; Pourmahdi &Taheri, 2015) مطابقت داشت. بررسی آناستوموز بین ریسه‌های جدایه‌های *R. solani* در این پژوهش با جدایه‌های استاندارد گروه‌های مختلف آناستوموزی این گونه نشانگر وقوع واکنش آناستوموز بین ریسه‌های جدایه‌های به‌دست‌آمده از لوبیا با جدایه متعلق به AG4 بود. تفکیک زیرگروه‌های مختلف این گروه آناستوموزی بر اساس واکنش آناستوموز ممکن نبود.

شناسایی گونه *R. solani* و تعیین گروه‌های آناستوموزی براساس آنالیز PCR-RFLP

الکتروفورز ناحیه rDNA-ITS تکثیرشده در واکنش PCR با کاربرد آغازگرهای RS1/RS4 نشانگر وجود یک باند به وزن مولکولی ۵۵۰جفت باز برای تمام جدایه‌های *R. solani* بود (شکل 1A). نتایج به‌دست‌آمده با نتایج سایر محققان در استفاده از این آغازگرها برای تکثیر ناحیه ژنومی مذکور در قارچ *R. solani* مشابه بود (Guillemaut *et al.*, 2003).

بررسی صورت‌گرفته در مورد تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌های *R. solani* به روش تماس ریسه‌ای مشخص کرد که تمام جدایه‌های این گونه به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر به گروه آناستوموزی AG4 تعلق دارند. در آناستوموز ریسه‌ای جدایه‌های مربوط به گروه آناستوموزی AG4 دیده شد که برخی از این جدایه‌ها با استرین‌های استاندارد مربوط به هر دو زیرگروه‌های آناستوموزی AG4 HG-I و AG4 HG-II AG4

آناستوموز می‌دهند. بنابراین، نتایج نشان داد که برای تعیین زیرگروه‌های آناستوموزی، استفاده از روش آناستوموز ریسه‌ای بر روی اسلاید امکان‌پذیر نمی‌باشد. این نتیجه با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات انجام‌شده بر روی جدایه‌های *R. solani* بیماریزا در گوجه فرنگی (Pourmahdi & Taheri, 2015) درباره توان آناستوموز هیفی میان جدایه‌های زیرگروه‌های مختلف مربوط به گروه آناستوموزی AG4 با یکدیگر مشابه بود.



شکل۱- نتایج PCR مربوط به DNA ژنومی*R. solani* (A) و باندهای به‌دست‌آمده در روش PCR-RFLP پس از هضم محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های *Ava*II و*Hinc*II برای جدایه‌های گروه آناستوموزی AG4 (B).

در شکلA شماره‌های ۱ تا ۷ به‌ترتیب جدایه‌های BR1، BR2، BR3، BR4، SR1، SR2 و FR1 می‌باشند.

در شکلBشماره‌های ۱، ۲و ۳ جدایه‌های زیرگروه AG4 HG-II، و ۴، ۵ و ۶ جدایه‌های زیرگروهAG4 HG-I می‌باشند.

M نشانگر مولکولی سایز باندهاست.

Fig. 1. PCR results of *R. solani* genomic DNA, and fragments obtained in the PCR-RFLP method after digestion of the PCR products using AvaII and HincII restriction enzymes for the isolates of AG4

Numbers 1 to 7 in the figure A are belonged to the isolates BR1, BR2, BR4, SR1, SR2, and FR1, respectively.

Numbers 1, 2, and 3 in the figure B are the isolates of AG4 HG-II, and 4, 5, and 6 are the isolates of AG4 HG-I

M: Molecular size marker

جدول ۱- نتایج آزمون بیماریزایی بر روی گیاهان لوبیاقرمز چهار هفته‌ای با استفاده از جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی

Table 1. Results of pathogenicity tests on 4 weeks old red bean plants using *Rhizoctonia solani* and binucleate Rhizoctonia isolates

میانگین طول زخم (میلی‌متر) Mean lesion length (mm)	گروه تاکسونومیکی Taxonomic group	جدایه[1] Isolate	میانگین طول زخم (میلی‌متر) (Mean lesion length mm)	گروه تاکسونومیکی Taxonomic group	جدایه[1] Isolate
19 cd	AG4 HG-I	FR8	5.5 b	AG4 HG-I	BR1
22.5 cd	AG4 HG-II	BR5	6 b	AG4 HG-I	BR2
9.5 bc	AG4 HG-II	BR6	8.5 bc	AG4 HG-I	BR3
8 bc	AG4 HG-II	BR8	9.5 bc	AG4 HG-I	BR7
11 bc	AG4 HG-II	BR10	19.5 c	AG4 HG-I	BR11
10 bc	AG4 HG-II	SR1	12.5 bc	AG4 HG-I	BR12
12 bc	AG4 HG-II	SR7	13 c	AG4 HG-I	BR13
12.5 bc	AG4 HG-II	SR8	14.5 c	AG4 HG-I	SR2
14.5 c	AG4 HG-II	FR1	12 bc	AG4 HG-I	SR3
17.5 cd	AG4 HG-II	FR2	15 c	AG4 HG-I	SR4
7.5b	AG4 HG-II	FR7	19.5 c	AG4 HG-I	SR5
8.5 bc	AG4 HG-II	BR14	27.5 d	AG4 HG-I	SR9
9 bc	AG4 HG-II	BR15	28 d	AG4 HG-I	FR3
8.5 bc	Binucleate	BR9	8.5 bc	AG4 HG-I	FR4
0 a	Binucleate	BR4	15 c	AG4 HG-I	FR5
4.25 b	Binucleate	SR6	15.5 c	AG4 HG-I	FR6

[1] حروف مورد استفاده در نام جدایه‌ها معرف منطقه نمونه‌برداری هستند. BR: بجنورد, SR: شیروان و FR: فاروج



شکل ۲- علایم بیماری ناشی از جدایه BR11 قارچ *Rhizoctonia solani* بر روی ساقه لوبیا

Fig. 2. Disease symptoms caused by the isolate BR11 of *Rhizoctonia solani* on the bean stem

بدین‌ترتیب برای تعیین زیرگروه‌های آناستوموزی از روش PCR-RFLP ناحیه ژنومی rDNA-ITS استفاده گردید (Guillemaut *et al*., 2003). همان‌طور که قبلاً ذکر شد، ابتدا ناحیۀ rDNA-ITS تمام جدایه‌های چندهسته‌ای از طریق دو آغازگر اختصاصی گونۀ *R. solani* تکثیر شد. سپس محصول PCR برای تمام جدایه‌ها توسط دو آنزیم برشی *Ava*II و *Hinc*II مورد هضم آنزیمی‌قرار گرفت. مقایسۀ نتایج به‌دست‌آمده از هضم آنزیمی ناحیه ژنومی rDNA-ITS جدایه‌های *R. solani* به‌دست‌آمده توسط این آنزیم‌های برشی با نتایج حاصل از مطالعات قبلی (Guillemaut *et al*., 2003) در مورد استرین‌های استاندارد نشان داد که جدایه‌های AG4 متعلق به زیرگروه‌های AG4 HG-I و AG4 HG-II بودند (شکل 1B). سایر محققان نیز برای تعیین زیرگروه‌های آناستوموزی AG4 به‌دست‌آمده از گیاه لوبیا از آنزیم‌های برشی *Ava*II و *Hinc*II استفاده کرده اند (Çebi Kiliçoğlu & Özkoç, 2010). از دو آنزیم برشی *Ava*II و *Hinc*II به‌صورت همزمان در یک واکنش استفاده گردید. الکتروفورز rDNA هضم‌شده بر روی ژل آگارز ۲درصد نشان داد که ۱۷ تا از جدایه‌های گروه آناستوموزی AG4 در هضم با آنزیم‌های برشی *Ava*II و *Hinc*II دو قطعه در حدود اندازه‌های ۰/۲۷ و ۰/۲۰ کیلو باز ایجاد می‌کنند و همچنین ۱۲جدایه یک قطعه در حدود ۰/۴۹۰ کیلو باز ایجاد کردند. مقایسۀ این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران (Guillemaut *et al*., 2003) تعیین کرد که ۱۷جدایه از گروه آناستوموزی AG4 به زیرگروه آناستوموزی AG4 HG-I و ۱۲جدایه به زیرگروه AG4 HG-II تعلق دارند (شکل 1B).

در این مطالعه برای اطمینان از تشخیص گروه‌های آناستوموزی به روش پیوند ریسه‌ای و نیز تعیین زیرگروه‌های آناستوموزی از برش آنزیمی‌توالی ناحیۀ ITS استفاده گردید. توالی ناحیۀ ITS به‌عنوان یک ابزار مهم در شناسایی و تعیین گروه‌ها و زیرگروه‌های آناستوموزی می‌باشد و نسبت به روش‌های قدیمی از دقت، سهولت و سرعت عمل بالاتری برخوردار است (Stojsin *et al*., 2007).

بررسی بیماریزایی

نتایج حاصل از بررسی بیماریزایی نشان داد که تمام جدایه‌های *R. solani* متعلق به AG4 HG-I و AG4 HG-II بر روی گیاهچه‌های لوبیا بیماریزا بودند، همچنین از سه جدایۀ رایزوکتونیای دوهسته‌ای دو جدایه علایم بیماری را ایجاد کردند. گیاهان شاهد که با بذور گندم عاری از قارچ مایه‌زنی شده بودند، هیچ علایمی از بیماری را نشان ندادند. علایم بارز بیماری بر روی گیاهان به‌صورت زخم‌هایی به رنگ قهوه‌ای در ناحیه ساقه مشاهده می‌شد (شکل ۲) که گاهی اوقات این زخم‌ها در سطح ریشه نیز توسعه پیدا می‌کردند. در برخی از جدایه‌ها که شدت بیماریزایی بیشتری داشتند، در ناحیۀ ساقه باریک‌شدگی مشاهده می‌شد که با سایر تحقیقات انجام‌شده در خصوص علایم ایجادشده توسط این بیماری در گیاه لوبیا مطابقت داشت (Balali & Kowsari, 2004; Keshavarz-Tohid & Taheri, 2015; Keshavarz-Tohid *et al*. 2016). آنالیزهای آماری داده‌های آزمایش‌های بیماریزایی نشان داد که شدت بیماریزایی در جدایه‌های زیرگروه‌های آناستوموزی AG4 HG-I و AG4 HG-II جدایه‌های مربوط به رایزوکتونیای دوهسته‌ای نیز دارای کمترین توان بیماریزایی بر روی گیاهچه‌ها بودند و حتی یک جدایه دوهسته ای فاقد توان بیماریزایی بود. اخیراً نتایج مشابهی در بررسی بیماریزایی گروه‌های مختلف تاکسونومیکی رایزوکتونیای بیماریزا در مزارع گوجه‌فرنگی استان خراسان رضوی مشاهده شد (Pourmahdi & Taheri, 2015).

با توجه به سایر گزارش‌ها درمورد کاربرد جدایه‌های کم آزار یا غیربیماریزای رایزوکتونیا در القای مقاومت علیه جدایه‌های شدیداً بیماریزای *R. solani* (Keshavarz-Tohid & Taheri, 2015) شاید بتوان در مبارزه بیولوژیک از این جدایه‌های دوهسته‌ای علیه جدایه‌های مخرب رایزوکتونیای عامل شانکر ساقه و ریشۀ گیاه لوبیا استفاده نمود. البته باید درمورد کاربرد جدایه‌های دوهسته‌ای علیه *R. solani*، تحقیقات تکمیلی دیگری از جمله بررسی دامنه میزبانی در محصولات زراعی رایج در منطقه صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص گردید که بیماری شانکر ریشه و ساقۀ لوبیا ناشی از *R. solani* در تمام مناطق کشت این گیاه در استان خراسان شمالی کم‌وبیش وجود دارد. همچنین مشخص شد که زیرگروه آناستوموزی AG4 HG-I شایع‌ترین گروه تاکسونومیکی است که در مزارع لوبیای استان خراسان شمالی وجود دارد. آزمون بیماریزایی نشان داد که زیرگروه‌های AG4 HG-I و AG4 HG-II از لحاظ توان بیماریزایی تفاوت معنی‌داری ندارند. این اولین گزارش از تعیین جایگاه دقیق تاکسونومیکی (تعیین AG و ISGs) جدایه‌های قارچ مخرب *R. solani* آلوده‌کننده لوبیا در ایران است. با توجه به این که لوبیا پس از سیب‌زمینی دومین محصول پُرارزش دنیا محسوب می شود و در کشور نیز از اهمیت بالایی برخوردار است، لذا ضرورت دارد که راه‌های کنترل این عامل قارچی که تأثیر به‌سزایی بر کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌گذارد، بیش از پیش مورد بررسی قرار گیرد و راهکارهای مناسب جهت مدیریت این بیماری اندیشیده شود.

منابع

1. Balali, G.R., and Kowsari, M. 2004. Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahn, Iran. Mycopathologia 158: 377-384.
2. Bandoni, R.J. 1979. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. Mycologia 71: 873-874.
3. Carling, D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis. In: B. Sneh, S.H. Jabaji-Hare, S. Neate, and G.Dijst. (Eds.). Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology, and Disease Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands., pp. 37-47.
4. Carling, D.E., Kuninaga, S., and Brainard, K.A. 2002. Hyphalanastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacers sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 (AG-2) and AG BI. Phytopathology 92: 43-50.
5. Çebi Kiliçoğlu, M., and Özkoç, İ. 2010. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of rDNA-ITS region. Turk Journal of Biology 34: 261-269.

6. Cubeta, M.A., and Vilgalys, R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathology 87: 480-484.
7. Falahati-Rastegar, M., Taheri, P., Jafarpour, B., Rouhani, H., and Mahdikhani-Moghadam, E. 2010. taxonomic identification of *Rhizoctonia* spp. associated with sugar beet root and crown rot using rDNA-ITS and PCR-RFLP analysis. Journal of Plant Protection 24: 285-293.
8. González García1, V., Portal Onco, M.A., and Rubio Susan, V. 2006. Biology and systematic of the form genus *Rhizoctonia.* Spanish Journal of Agricultural Research 4: 55-79.
9. Godoy-Lutz, G., Kuninaga, S., Steadman, J.R., and Powers, K. 2008. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. Journal of General Plant Pathology 74:32-40.
10. Guillemaut, C., Hermann, V.E., Camporota, P., Alabouvette, C., Molard, M.R., and Steinberg, C. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. Canadian Journal of Microbiology 49: 556-568.
11. Herr, L.J. 1996. Sugar beet diseases incited by *Rhizoctonia* spp. *InRhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,Netherlands. pp. 341-350.
12. Keshavarz-Tohid, V., and Taheri, P. 2015. Investigating binucleate *Rhizoctonia* induced defence responses in kidney bean against *Rhizoctonia solani.* Biocontrol Science and Technology 25: 444-459.
13. Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., Taghavi, S.M., and Tarighi, S. 2016. The role of nitric oxide in basal and induced resistance in relation with hydrogen peroxide and antioxidant enzymes. Journal of Plant Physiology, Doi:10.1016/j.jplph.2016.05.005.
14. Nerey, Y., Pannecoucque, J., Hernandez, H.P., Diaz, M., Espinosa, R., De Vos, S., and Hofte, M. 2010. *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. Journal of Phytopathology 158: 236-243.
15. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *R. solani* Kühn. Annual Review of Phytopathology 23: 23-45.
16. Ogoshi, A. 1996. The genus *Rhizoctonia*. In*:* B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate, and G. Dijst (Eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and diseasecontrol. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-9.
17. Pourmahdi, A., and Taheri, P. 2015. Genetic diversity of *Thanatephorus cucumeris* infecting tomato in Iran. Journal of Phytopathology 163: 19-32.
18. Sneh, R., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 133pp.
19. Taheri, P., Gnanamanickam, S., and Höfte, M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. Phytopathology 97: 373-383.
20. Vilgalys, R., and Cubeta, M.A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. Annual Review of Phytopathology 32: 135-155.
21. Yang, G.H., Chen, J.Y., and Pu, W.Q. 2007. First report of head rot of cabbage and web blight of snap bean caused by Rhizoctonia solani AG-4 HGI. Plant Pathology 56: 351-351.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 9, No. 1, 2018, p. 142-151

Taxonomnic status and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolates, causing bean stem and root canker in Northern-Khorassan province

Taheri[1]*, P. & Daroodi[2], Z.

1. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. PhD. Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 13 June 2016
Accepted: 10 December 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v9i1.56724

Introduction

Red bean (*Phaseolus vulgaris*) is an important legume cultivated in various areas with different climates worldwide. Bean damping-off, stem and root canker are caused by several fungal pathogens. Soil-borne pathogenic fungi are the most important pathogens in bean plants, which cause destructive diseases. *Rhizoctonia solani* is one of the most serious causal agents of stem and root canker that is reported in all kinds of beans. The Rhizoctonia species belong to Basidiomycota which are the causal agents of various diseases different monocots and dicots with high yield losses. The isolates of *R. solani* are classified into 13 anastomosis groups (AGs). The most common AGs of *R. solani* which infect bean plants are AG-1 IE, AG-1 IF, AG-2-2, AG-2-3, AG-BI, AG-4 and AG-5. In overall, isolates of AG-4 HG-II were more virulent in peas, soybeans and beans compared to other AGs. Knowledge of taxonomic status of *Rhizoctonia* spp. causing bean diseases in different geographic regions of Iran is still scarce. However, accurate identification of various taxonomic groups in *Rhizoctonia* spp. populations is necessary for designing effective disease management strategies. So, we identified the accurate taxonomic status of *R. solani* isolates causing bean diseases. Also, pathogenicity of these fungal isolates was investigated on red bean.

Materials & Methods

Red bean plants with the symptoms of stem and root canker were sampled during growing season of 2014 in the fields of this crop for characterizing various taxonomic groups of pathogenic *Rhizoctonia* spp. Symptomatic bean tissues were surface-disinfected with 0.5% sodium hypochlorite solution for 2 min and rinsed three times with sterile distilled water. Then, pieces of the stem or root tissues were dried on sterilized filter paper, placed on a potato dextrose agar (PDA) petri dish containing chloramphenicol, and incubated at 28°C in dark conditions. After 2 to 3 days, cultures were examined microscopically for hyphal characteristics typical of *Rhizoctonia* spp. All plated samples readily yielded *Rhizoctonia* spp., and a hyphal tip of each isolate was subcultured onto AWA for further purification. Isolates were transferred to PDA test tube slants and maintained at 28°C. Fungal isolates were initially characterized as either binucleate or multinucleate by the trypan blue staining technique. Colonies of *Rhizoctonia* on PDA, 2 to 3 days old, were stained to determine nuclear number and were examined for the presence of a septal pore (dolipore) apparatus. The width of the main runner hyphae was investigated from the same preparations. Isolates were subcultured onto PDA petri dishes in triplicate, incubated at 28°C for 3 weeks, and compared for colony morphology and the size and shape of moniloid cells and sclerotia. *Rhizoctonia* spp. isolates were distinguished using specific primers for PCR amplification based on the ITS region of *R. solani*. PCR-RFLP of rDNA-ITS region was used to determine the taxonomic group of each *R. solani* isolate. Genomic DNA of the isolates was used for PCR amplification of the ITS region using a pair of primers, RS1 (5′-CCTGTGCACCTGTGAGACAG-3′) and RS4 (5′-TGTCCAAGTCAATGGACTAT-3′). Restriction polymorphisms were detected using two discriminating restriction enzymes, *Ava*II and *Hinc*II.

***Corresponding Author:** p-taheri@um.ac.ir

Results & Discussion

32 Rhizoctonia isolates were obtained from culturing the infected plant tissues. Identification of these isolates was carried out using morphological and molecular methods. Among 32 isolates, 29 isolates belonged to multinucleate *R. solani* and 3 were binucleate *Rhizoctonia* spp. Investigating restrictesd PCR products on agarose gel was performed and anastomosis gropus and subgroups were determined. Among 29 *R. solani* isolates, 17 isolates were AG4 HG-I and 12 isolates belonged to AG4 HG-II. Pathogenicity testes on red bean cv. Naz revealed that all isolates of *R. solani* were pathogenic on bean. Lower level of pathogenicity was observed for the binucleate Rhizoctonia isolates on the root and stem of host plant. Similar levels of pathogenicity were observed for the isolates of AG4 HG-I and AG4 HG-II. This is the first report on exact taxonomic status of Rhizoctonia isolates, on the anastomosis groups and subgroups levels, obtained from bean field of Iran.

Conclusion

It can be concluded that *R. solani* AG4 HG-I is the main taxonomic group of Rhizoctonia, causing stem and root canker on bean plants in the regions investigated in this research. Binucleate Rhizoctonia isolates, which were hypovirulent or avirulent on bean plants bight be used in biocontrol assays to investigate their potential for inducing host defense responses against highly pathogenic *R. solani* isolates.

Key words: Identification, PCR-RFLP, *Phaseolus vulgaris,* Taxonomic group, *Thanatephorus cucumeris*